

## 慢性腎臓病における高回転型ならび低回転型骨代謝異常と心・腎・血管の異所性石灰化及び線維化に関する検討

Characterization of High and Low Turnover Bone Disease Associated with Chronic Kidney Disease: Study on Ectopic Calcification and Fibrosis in Heart, Kidney and Aortic

伊藤哲平 (Teppei ITO)

Bone mineral metabolism disorders associated with chronic kidney disease (CKD) can be classified into high and low turnover bone disease. We previously showed that the femur in high turnover disease was characterized by a decrease in the number of trabeculae, mineral-to-matrix ratio, carbonate-to-phosphate ratio, and collagen fiber orientation. However, an increase in hydroxyapatite crystallite orientation has been reported to cause a decrease in bone strength under multiple stresses. In this work, rat femurs in both high and low turnover disease associated with CKD were examined using FTIR imaging to characterize and compare bone quality between high and low turnover disease.

### 【研究背景】

慢性腎臓病(CKD)に伴うミネラル代謝異常(CKD-MBD)はさまざまな臓器障害を引き起こし、異所性石灰化や線維化を発症する<sup>1)</sup>。CKD-MBDには骨代謝が亢進する高回転型と停滞する低回転型が報告されているが、骨代謝異常と異所性石灰化、線維化の関連については未だ不明な点が多い。

本研究では、CKDに伴う高・低回転型骨代謝異常を示すラットを作製し、可視化技術を開発しながら病態組織の解析を行い、骨代謝異常と心・腎・血管の異所性石灰化、線維化の関連について検討することを目的とした。本報告では、「慢性腎臓病における高回転型ならび低回転型骨代謝異常の可視化・解析」及び「臨床応用が可能な薄切標本作製法の開発」について発表する。

### 【実験動物】

7週齢のSDラット雄に5/6腎摘出術を施した高回転型骨代謝異常を示すCKDモデル(H-CKD)と5/6腎摘出術と副甲状腺摘出術を施した低回転型骨代謝異常を示すCKDモデル(L-CKD)を作製し、PとCaの量を調整した飼料を与えながら18週間飼育した。20週齢のBALB/cAマウス雄は、薄切標本作製法を検証するために用いた。

### 【実験方法】

CKDラットから摘出した大腿骨は、PMMA包埋を施し3 µmの薄切片にした。BALB/cAマウスから摘出した左大腿骨は、洗浄後に極薄フィルムを用いた凍結切片法により3 µmの薄切標本にした。同マウスから摘出した右大腿骨は、洗浄、70%エタノール固定、PMMA包埋後に3 µmの薄切標本にした。石灰化度、炭酸塩含有率、結晶化度、結晶成熟度の評価は赤外イメージング、骨アパタイト結晶とコラーゲン線維配向性の評価は赤外二色性イメージングを用いた<sup>2,3)</sup>。

## 【結果・考察】

### 高回転型ならび低回転型骨代謝異常の可視化・解析

各 CKD モデルは、生化学検査から高回転型および低回転型であることを認めた。いずれの CKD も、石灰化度、結晶化度に有意差は認めないが、H-CKD ラットの炭酸塩含有率は有意に減少した。低結晶性アパタイトの偏光赤外吸収強度の角度依存性を調べた結果、H-CKD、L-CKD 共に骨幹で角度依存性を示した。また、赤外二色性イメージを比較した結果、骨幹端における低結晶性アパタイトとコラーゲン線維の配向性は、健常ラットに比べて低下することを認め、その傾向は H-CKD の方が著しいことを確認した。これらの結果から、CKD に伴う骨脆弱性は、骨幹端における低結晶性アパタイトとコラーゲン線維の配向性低下に特徴付けられた。

### 臨床応用が可能な薄切標本作製法の開発

同じマウスから摘出した大腿骨の凍結切片と PMMA 包埋による切片の赤外スペクトルを比較した結果、 $\text{PO}_4^{3-}$  と amide I バンドの形状が異なることが認められた。凍結切片の皮質骨と海綿骨の石灰化度、結晶化度は、PMMA 包埋による切片に比べて低値を示した。一方、炭酸塩含有率は、PMMA 包埋による切片が低値を示した(Fig.1)。皮質骨におけるコラーゲン線維の偏光赤外吸収強度の角度依存性を調べた結果、凍結切片、PMMA 包埋による切片共に角度依存性を認めたが、その傾向は必ずしも一致しなかった。これらの結果から、PMMA 包埋による切片の骨質データは、新鮮骨と異なることが示された。

## 【結論】

CKD に伴う骨脆弱性は、骨幹端における低結晶性アパタイトとコラーゲン線維配向性低下に特徴付けられ、この傾向は L-CKD に比べ H-CKD で著しいことが示された。また、薄切標本作製法の検討では、アルコール固定ならび PMMA 包埋が骨質に影響を及ぼすことが認められ、赤外イメージングによる骨質解析は極薄フィルムを用いた標本作製法が極めて有効であることが示された。

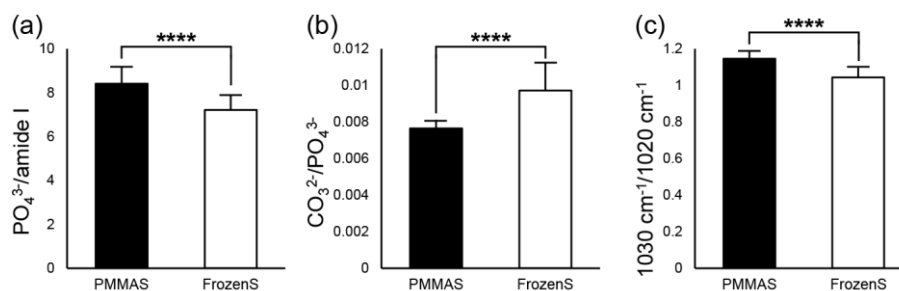


Fig. 1 In cortical bone, the mineral/collagen (a), carbonate/phosphate (b), crystallinity (c) in FTIR imaging.

- 1) Young EW, Akiba T, Albert JM, et al. Kidney Int., 67, 1179-1187 (2009)
- 2) Ito T, Kimura-Suda H, MCLC in press
- 3) Ito T, Kanazawa K, Kimura-Suda H, MCLC., 662, 114-119 (2015)